

① RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 691 465

⑫ N° d'enregistrement national : **92 06361**

⑬ Int Cl⁵ : C 07 K 5/10, 17/10, A 61 K 37/02, 9/50, 7/00, 47/48

⑭

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑮ Date de dépôt : 25.05.92.

⑯ Priorité :

⑰ Demandeur(s) : *FABRE MEDICAMENT Pierre* — FR.

⑱ Inventeur(s) : Dussourd d'Hinterland Lucien, Cousse Henri, Pinel Anne-Marie et Martinez Jean.

⑲ Date de la mise à disposition du public de la demande : 26.11.93 Bulletin 93/47.

⑳ Liste des documents cités dans le rapport de recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

㉑ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

㉒ Titulaire(s) :

㉓ Mandataire : Cabinet Regimbeau Martin Schrimpf Warcoin Ahner.

㉔ Complexes comprenant au moins un peptide dérivé de l' α MSH, peptide, microsphère, médicament et composition galénique les comprenant.

㉕ La présente invention concerne un complexe du type comprenant au moins un peptide, capable d'induire une activité anti-inflammatoire, anti-allergique ou immunosuppressive vis-à-vis des interleukines du groupe IL1-IL6- α TNF, dans lequel le peptide présente une séquence d'au moins quatre acides aminés extraits de l' α MSH, ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels, d'esters ou d'amides, un peptide dérivé de l' α MSH et une microsphère comprenant au moins le complexe tel que défini.

L'invention concerne également un médicament ou une composition galénique comprenant un complexe, un peptide ou une microsphère.

FR 2 691 465 - A1



La présente invention concerne des complexes du type comprenant au moins un peptide dérivé de l' α -MSH et capable d'induire une activité anti-inflammatoire, anti-allergique ou immunosuppressive vis-à-vis des interleukines du groupe IL1 - IL6 - α -TNF.

5 L'étude des peptides neurotransmetteurs, en particulier ceux de la classe des Enképhalines et Endorphines a fait l'objet de nombreux travaux concernant leur rôle de médiateurs et de modulateurs, dans certaines réponses vasculaires et nerveuses liées à des désordres cutanés.

Ces peptides font partie du système " endorphine-lipotropine" et sont concentrés dans l'axe "hypothalamique - neurohypophysaire" qui induit leur synthèse. Parmi les peptides dérivant d'un même précurseur la "Pro-Opio-Mélanocortine" il faut citer l'ACTH, l' α -MSH et la β -endorphine.

10 L' α -MSH ou Mélanotropine est connue pour sa capacité d'activer et de réguler les différents processus d'induction et de transduction cellulaires de la mélanogénèse.

La présente invention repose sur la mise en évidence de l'activité biologique de peptides dérivés de l'ACTH et de l' α -MSH notamment lorsqu'ils sont utilisés sous forme de complexes avec une matrice polysaccharidique.

20 Plus particulièrement, la présente invention concerne un complexe du type comprenant au moins un peptide capable d'induire une activité anti-inflammatoire, anti-allergique ou immuno-suppressive vis-à-vis des interleukines du groupe IL1 - IL6 - α -TNF, présentant une séquence d'au moins quatre acides aminés extraits de l' α -MSH, lesdits acides aminés étant sous forme naturelle ou non, conjugués physiquement ou chimiquement à un élément polysaccharidique de haut poids moléculaire.

Parmi les séquences peptidiques utilisables selon l'invention, il faut citer les séquences de formule :

X-Glu-His-A-Arg-Trp-Gly-Y

30 dans laquelle A représente Phe ou DPhe, et X et Y sont choisis parmi :
- les fonctions acides ou aminées de l'acide aminé correspondant,
- une séquence d'acides aminés ne comprenant pas plus de quatre acides aminés,

35

ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels, d'esters ou d'amides.

Dans un mode préféré de l'invention, X est choisi parmi HMet-, HNle-, H-Ser-Tyr-Ser-Met-, H-Ser-Tyr-Ser-Nle, Ac-Nle-, Ac-Leu-, Ac-Ile-, et Y
5 choisi parmi -NH₂, -OH.

Les séquences d'acides aminés mentionnées précédemment peuvent être des séquences d'acides aminés naturels ou des séquences d'acides aminés non naturels, de même dans certains cas, il est possible que certains de ces acides comportent des fonctionnalisations, par exemple de
10 glycosylations ; il doit être entendu que l'ensemble de ces formes est couvert dans la présente description.

Dans les complexes selon la présente invention, l'élément polysaccharidique est de préférence un polysaccharide réticulé qui peut être d'origine bactérienne, par exemple il peut provenir de souches de type
15 *Klebsiella* comme *Klebsiella pneumoniae*.

Le complexe peut être réalisé par réaction chimique et donc établissement d'une liaison covalente entre l'élément polysaccharidique servant de matrice et le peptide, et/ou une conjugaison physique dans laquelle l'élément polysaccharidique et le peptide sont liés uniquement par
20 des interactions non covalentes.

Ce type de complexe présente l'intérêt de pouvoir être aisément mis sous forme d'une microsphère en le recouvrant de feuillets d'acides gras et/ou de phospholipides selon une technologie qui a été décrite de façon générale sous la terminologie de biovecteurs supra-molé-
25 culaires.

Ce type de microparticules présente l'avantage de protéger les principes actifs peptidiques contre l'hydrolyse des enzymes de l'épiderme tels que les exopeptidases, les endopeptidases, les aminopeptidases, les carboxypeptidases, ou les dipeptidases et leur permettre ainsi
30 d'atteindre les récepteurs cellulaires.

Ces micro-particules ou biovecteurs transcutanés comprennent ainsi outre un noyau polysaccharidique sur lequel se trouve fixé le principe actif, au moins une couche lamellaire de lipoprotéines et de phosphatides.

On préfère en général utiliser un polysaccharide naturel ou un polysaccharide réticulé obtenu par exemple par traitement à l'épichloridrine sur lequel on fixe les chaînes latérales des composés peptidiques précédemment décrits. Ce noyau matriciel actif ainsi réalisé est ensuite
5 entouré de différentes couches lamellaires de phosphatides et de lipoprotéines à hauts poids moléculaires. Selon un mode préféré de la présente invention, les acides gras sont faiblement greffés et les phospholipides interdigités. Le diamètre de ces biovecteurs peut être standardisé par passages successifs sur une presse Manton-Gaulin avec des
10 pressions appropriées. Les biovecteurs sont ensuite lyophilisés ou atomisés à des températures inférieures à 60 ou 80°C de façon à maintenir l'activité des principes actifs.

Comme cela a été indiqué précédemment, les dérivés peptidiques de la présente invention sont utilisés de préférence sous forme
15 de sels, d'esters ou d'amides avec des molécules biochimiques présentant au moins quatre atomes de carbone alicyclique et dont le rôle est de faciliter la liaison des composés peptidiques avec des récepteurs de classe G des membranes cellulaires ainsi que les processus de transduction par activation de l'AMPC. Ces formes particulières présentent en outre l'avantage en
20 utilisant des groupements biochimiques connus pour leur activité inhibitrice ou bloquante des phosphodiesterases, d'augmenter la durée de vie des complexes selon la présente invention.

Parmi ces types de dérivés, il faut citer les sels, les esters ou les amides

- 25
- d'acides alcools ;
 - de diacides ;
 - de nucléotides non naturels,

notamment les acides-alcools et les diacides choisis parmi ceux comprenant de trois à six atomes de carbone, ainsi que les dérivés acylés ou diacylés du
30 glycol ou du glycérol, par exemple les acides hydroxybutyriques ou méthylhydrobutyriques.

Il est également possible d'utiliser des nucléotides non naturels présentant un groupement triphosphate en position trois, avec un radical CH₂ au lieu de O.

35

Parmi les produits permettant de protéger les chaînes peptidiques il faut citer :

- l'acide méthyl-malonylique ($\text{CO}_2\text{H}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CO}_2$)
- l'acide β -hydroxybutyrique ($\text{CH}_3-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$)
- 5 - l'acide β -hydroxybutyrylique ($\text{CH}_3-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CO}_2\text{H}$)
- le diacyl glycérol
- le nucléotide guanosine triphosphate, dans lequel le groupement triphosphate contient en position 3 un radical - CH_2 en remplacement de -O-.

10 La présente invention concerne également un peptide biologiquement actifs comprenant au moins une séquence de formule :



dans laquelle A représente Phe ou DPhe, et X est choisi parmi HMet-, HNle-, H-Ser-Tyr-Ser-Met-, H-Ser-Tyr-Ser-Nle, Ac-Nle-,
15 Ac-Leu-, Ac-Ile-, et Y choisi parmi $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$

D'une manière préférentielle, il comprend au moins une des séquences suivantes :

- 1) H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly - NH_2
- 2) H-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly - NH_2
- 20 3) H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH
- 4) H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly- NH_2
- 5) H-Met-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly- NH_2
- 6) Ac-Nle-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly- NH_2
- 7) Ac-Leu-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly- NH_2
- 25 8) Ac-Ile-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly- NH_2

notamment lorsqu'ils se présentent sous formes de sels, d'esters ou d'amides tels qu'ils ont été décrits précédemment.

Les peptides 5 à 8, dont les séquences possèdent en position 4 l'acide aminé DPhényl sont particulièrement orientés vers une stimulation
30 des processus de mélanogénèse par activation de la tyrosinase mélanocytaire.

Les séquences peptidiques selon la présente invention peuvent être obtenues par l'un des procédés quelconques connus de l'homme de métier, notamment elles peuvent être obtenues par coupure à partir de l'ACTH naturelle d'origine porcine ou autre, mais elles peuvent être également obtenues par synthèse chimique et/ou dans le cas où les séquences peptidiques sont plus importantes, obtenues par des techniques de recombinaison génétique.

En tout état de cause, compte-tenu la plupart du temps, de la faible dimension de ces peptides, la synthèse chimique est tout à fait possible et permet d'obtenir des produits très purs.

Lorsque l'on utilise la fragmentation enzymatique, celle-ci peut conduire à des mélanges de produits, dans certains cas, il est possible d'utiliser directement certains de ces mélanges pour la réalisation des complexes selon la présente invention.

La présente invention comprend également les dérivés peptidiques précédents, mais obtenus par racémisation, ainsi que par synthèse peptidique de ces dérivés racémisés.

La racémisation porte sur certaines séquences peptidiques et présente l'intérêt d'orienter ces molécules vers une activité pharmacologique spécifique d'activation de la mélanogénèse par stimulation des tyrosinases et des mélanosomes.

Les complexes selon l'invention, les peptides ainsi que les micro-particules tels que définis précédemment, sont plus particulièrement utilisables dans des compositions dermatologiques par application topique externe en association avec un excipient de type connu pour réaliser des crèmes, des lotions, des sprays, ou tout autre forme galénique appropriée. Ces compositions dermatologiques peuvent être aussi bien utilisées en cosmétologie qu'en dermo-cosmétologie, dans ce cas la présente invention concernera évidemment les médicaments caractérisés en ce qu'ils comportent un complexe selon la description précédente, ou une microsphère et/ou un peptide tel que décrit précédemment.

Les complexes ainsi que les peptides selon l'invention présentant les caractéristiques biologiques d'être des anti-inflammatoires,

des anti-allergiques, et des immuno-suppresseurs vis-à-vis des interleukines du groupe IL1 - IL6 - γ TNF, pourront donc être utilisés dans un grand nombre de thérapies, tant curatives que préventives comme cela sera démontré ci-après.

5 Bien entendu, ces molécules conservent un axe d'activation de la mélanogénèse par stimulation des tyrosinases des mélanosomes qui pourront également être mises à profit lorsque cela pourra se révéler nécessaire.

10 La présente invention concerne également une composition galénique caractérisée en ce qu'il s'agit de préparations dermato-cosmétologiques, sous forme de solutions, de lotions, d'émulsions ou de crèmes utilisées comme accélérateur de bronzage de la peau et comprenant au moins un des complexes ou peptides décrits précédemment.

15 D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples ci-après.

Exemple 1 :

20 **Obtention des fractions peptidiques à partir de l'ACTH de porc**

Le fractionnement est obtenu par action de la trypsine selon la technique de SANGER.

25 L'action de la trypsine s'effectue préférentiellement sur les liaisons Arg et Lys. L'hydrolyse de la fraction 24 AA Terminal de l'ACTH donne les fragments peptidiques suivants :

- | | | |
|----|-------------------------|------------------|
| | 1) 3 fragments d' 1 A-A | (146 < PM < 174) |
| | 2) 2 fragments de 3 A-A | (378 < PM < 425) |
| | 3) 1 fragment de 4 A-A | (PM 453) |
| 30 | 4) 1 fragment de 8 A-A | (PM 1280) |
| | 5) 1 fragment de 18 A-A | (PM 2302) |

Parmi les 4 premiers fragments peptidiques, seul le fragment 4 de 8 amino-acides correspond à la séquence terminale de l' γ MSH.

- 1000 Unités d'ACTH poudre (SIGMA A 6303, 5 mg) sont dissouts dans 0,9 ml de tampon Tris à pH 8,5.

- on ajoute 500 Unités de Trypsine (SIGMA T. 1005) en solution dans 100 ml de tampon Tris 0,05 M à pH 8,5 (l'enzyme est solubilisée extemporanément).

- on met au bain-marie, maintenu à 25°C, pendant 10 minutes.

- on ajoute un pH 4,5 et on chauffe 10 minutes à 100°C.

Les fractions peptidiques ainsi obtenues sont séparées par chromatographie sur gel PHARMACIA G-25 et G-15.

La différence de poids moléculaire entre ces fractions peptidiques en facilite la purification par chromatographie d'exclusion sur gel Pharmacia G-25. En particulier pour la fraction 4 composée de 8 amino-acides et dont le poids moléculaire est de 1280 daltons.

- on élue avec du Tampon Tris à pH 7,5.

les fractions recueillies sont lyophilisées et analysées par électrophorèse (PHAST PHARMACIA) sur gel d'Acrylamide.

Exemple 2 :

Synthèse des analogues peptidiques

Le dérivé 4 a été préparé par la méthode de MERRIFIELD à partir d'une résine chlorométhylée (copolymère de styrène à 1% de divinylbenzène). La Boc-Glycine a été fixée sur cette résine par la méthode de GISIN. Le degré de substitution est de 0.6 meq de Boc-Gly par gramme de résine. La stratégie BOC a été utilisée, avec les acides aminés suivants : Boc-Trp(For), Boc-Arg(Tos), Boc-Phe, Boc-His(Boc), Boc-Glu(OBzl), Boc-Met, Boc-Nle. Le réactif BOP a été utilisé comme agent de couplage. La déprotection finale a été effectuée par la technique du "Low-High" HF. Les peptides ont été purifiés par HPLC et identifiés par analyse d'acides aminés, ou RMN du ^1H à 360 MHz.

Les composés 3, 5, 6 et 9 ont été préparés en utilisant une résine benzhydramine (copolymère de styrène à 1 % de divinylbenzène

fonctionnalisé par une -aminobenzyle). Le degré de fixation du premier acide aminé (Boc-Gly ou Boc-Val) est de 0.5 meq/g de résine approximativement. La stratégie BOC a été utilisée avec les acides suivants : Boc-Trp(For), Boc-Arg(Tos), Boc-Phe, Boc-His(Boc), Boc-Glu(OBzl), Boc-Met, 5 Boc-Nle, Boc-DPhe, Boc-Pro, Boc-Lys(2-Cl-Z), Boc-Gly. L'acétylation des composés 8,9 et 10 a été effectuée en utilisant AcOSu, le peptide étant fixé sur la résine. Le réactif BOP a été utilisé comme agent de couplage. La déprotection finale a été effectuée par la technique du "Low-High" HF. Les peptides ont été purifiés par HPLC et identifiés par analyse d'acide 10 aminés, ou RMN du ^1H à 360 MHz.

A titre d'exemple, les constantes physiques de quelques composés sont données.

(3) H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH

15

PF = 130°C, décomposition.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -5$ (c = 0.5 DMF).

HPLC : colonne C_{18} , 5 μm , débit 7 mL/min, détection 279 nm, solvant d'élution TFA 0.1%/acétonitrile 77/23 v/v, temps de rétention 28.80 min.

20

^1H RMN (DMSO-d_6) ppm : Nle (3.77, 1.62, 1.24, 0.82) ; Glu (8.53, 4.32, 1.82-1.71, 2.25) ; His (8.11, 4.53, 2.98-2.83) ; Phe (8.06, 4.47, 2.99-2.77, 7.25-7.1) ; Arg (8.32, 4.30, 1.69-1.55, 1.45, 3.07) ; Trp (8.02, 4.59, 3.16-3.00, 10.78, 7.15, 7.58, 7.30, 7.04, 6.96) ; Gly (8.18, 3.70).

25

(4) H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-NH₂

PF = 120°C, décomposition.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -7$ (c = 0.4 DMF).

HPLC : colonne C_{18} , 5 μm , débit 7 mL/min, détection 279 nm, solvant d'élution TFA 0.1%/acétonitrile 77/23 v/v, temps de rétention 30.45 min.

30

^1H RMN (DMSO-d_6) ppm : Nle (4.76, 1.62, 1.24, 0.82) ; Glu (8.54, 4.32, 1.86-1.72, 2.24) ; His (8.09, 4.53, 2.95-2.82) ; Phe (8.09, 4.53, 3.00-2.78, 7.3-7.0) ; Arg (8.36, 4.29, 1.54-1.68, 1.45, 3.07) ; Trp (8.07, 4.53, 3.16-3.01, 10.80, 7.19, 7.56, 7.30, 6.96) ; Gly (8.18, 3.67-3.54).

35

(6) Ac-Nle-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly-NH₂

PF = 110°C décomposition

[α]_D = 31,4 (c=0,35 DMF)

Chromatographie en couche mince (plaques de gel de

5 silice 60 F₂₅₄ Merck, Darmstad, Allemagne) :

Rf = 0,10 (Acétate d'éthyle 50, Pyridine 20, acide acétique 5, eau 10).

Rf = 0,26 (Acétate d'éthyle 40, Pyridine 20, acide acétique 5, eau 10).

HPLC : appareil Merck-Hitachi, colonne SFCC C₁₈ (10 μ M)

22,5 x 150 mm, détection 279 nm, solvant isocartique TFA 0,1%/Acétonitrile

10 73:27, débit 7ml/min, temps de rétention 29,6 min.

Analyse d'acides aminés, HCl 6N, 110°C, 24 heures : Nle

1.00 ; Glu 0,95 ; His 0,92 ; Phe 0,96 ; Arg 0,92 ; Trp 0,88 ;

Gly 0,98.

15

(7) Ac-Leu-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly-NH₂

PF = 120°C, décomposition

Chromatographie en couche mince (plaques de gel de

silice 60F₂₅₄ Merck, Darmstad, Allemagne) :

Rf = 0,09 (Acétate d'éthyle 50, Pyridine 20, acide acétique 5, eau 10).

20 Rf = 0,24 (Acétate d'éthyle 40, Pyridine 20, acide acétique 5, eau 10).

HPLC, appareil Merck-Hitachi, colonne SFCC C₁₈ (10 μ M)

22,5 x 150 mm, détection 279 nm, solvant isocratique TFA 0,1%/Acétonitrile

73:27, débit 7ml/min, temps de rétention 30,5 min.

Analyse d'acides aminés, HCl 6N, 110°C, 24 heures : Leu

25 1,00 ; Glu 0,93 ; His 0,92 ; Phe 0,94 ; Arg 0,93 , Trp 0,85 ; Gly 0,97.

(8) Ac-Ile-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly-NH₂

PF = 110°C, décomposition

Chromatographie en couche mince (plaques de gel de

30 silice 60 F₂₅₄ Merck, Darmstad, Allemagne) :

Rf = 0,11 (Acétate d'éthyle 50, Pyridine 20, acide acétique 5, eau 10).

Rf = 0,26 (Acétate d'éthyle 40, Pyridine 20, acide acétique 50, eau 10).

HPLC : appareil Merck-Hitachi, colonne SFCC C₁₈ (10µM)
22,5 x 150 mm, détention 279 nm, solvant isocratique TFA 0,1%/Acéto-
nitrile 73:27, débit 7ml/min, temps de rétention 29,7 min.

Analyse d'acides aminés, HCl 6N, 110°C, 24 heures : Ile
1,00 ; Glu 0,96 ; His 0,90 ; Phe 0,95 ; Arg 0,94 ; Trp 0,86 ; Gly 0,95.

Exemple 3 :

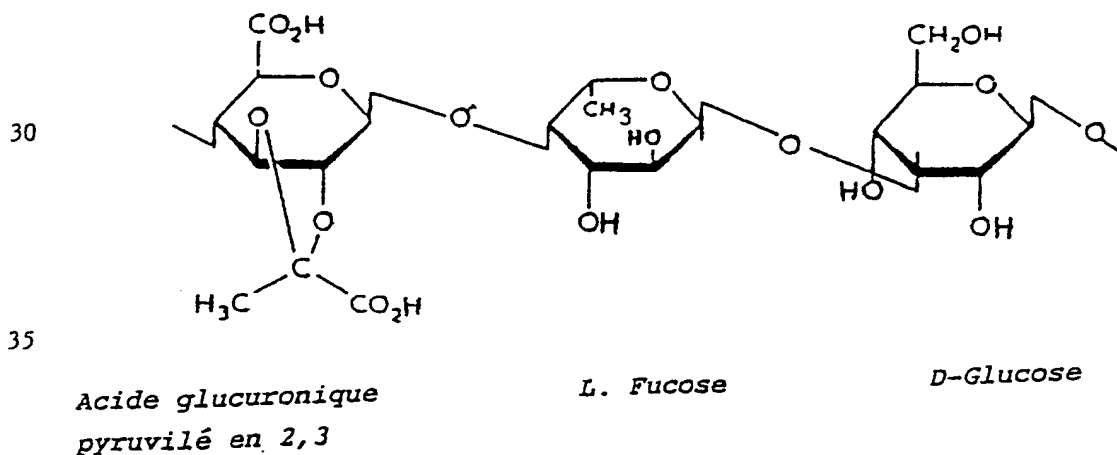
- 10 Synthèse du complexe contenant le peptide conjugué à un élément
polysaccharidique

I. Structure de l'élément polysaccharidique

- 15 L'élément polysaccharidique utilisé pour synthétiser ce
complexe est un exopolysaccharide sécrété par la souche *Klebsiella*
pneumoniae type I, et sera codé DC-15.

- Cet EPS est extrait du milieu de culture après élimination des
cellules bactériennes. Après isolement et purification, le produit est séché
20 et se présente sous forme d'une poudre de couleur blanche et très
hygroscopique.

- L'étude de la structure du DC-15 a permis de montrer qu'il
était essentiellement composé d'une forme monomérique comprenant du D
glucose, de l'acide D glucuronique, du L fucose et de l'acide pyruvique
25 enchaînés selon le schéma ci-dessous :



La présence de fonctions acétals, qui peuvent s'hydrolyser en milieu acide, conduit à travailler en milieu neutre ou basique afin d'éviter toute dégradation. Ces conditions entraînent des conséquences importantes au niveau de l'arrangement des chaînes polysaccharidiques en solution.

5

	<u>Composants</u>	<u>%</u>
	acides uroniques	23.7
	glucose	18
10	méthyl pentose	21.2
	acide pyruvique	5.6
	galactose	4.8
	azote total	0.28
	cendres	19.4
15	H ₂ O	13
	acides nucléiques	0.1
	protéines	1.4

20 2. Réaction du DC-15 avec le chlorure de magnésium

Le DC-15 (0.102 gr) est dissous dans 3 ml d'eau distillée. Une solution saturée de MgCl₂ (3 ml) est ajoutée par fractions à température ambiante et sous agitation.

25 3. Réaction du DC-15 avec le chlorure de l'acide succinique

Le DC-15 (200 mg) est dissous dans 2 ml d'eau distillée. On ajoute à cette solution 121 mg de Na₂CO₃, puis 100 µl de chlorure d'acide succinique. Le mélange est maintenu sous agitation à température ambiante.

30

4. Réaction du DC-15 et de l'éthylène diamine

Le DC-15 (100 mg) est dissous dans 1 ml d'eau distillée. On

35

ajoute sous agitation 191 mg d'EDC et 100 mg de N hydroxysuccinimide. Quand la mélange est homogène, on ajoute 111 µl d'éthylène diamine et on laisse la réaction se poursuivre pendant deux heures.

5 5. Co-réticulation du DC-15 et de l'amidon soluble

L'amidon soluble (9 g) et le DC-15 (1 g) sont introduits dans un ballon de 250 ml muni d'une agitation mécanique. On ajoute 10 ml d'une solution de soude 3M et l'agitation est poursuivie jusqu'à obtention d'une solution homogène. On ajoute alors 390 µl d'épichlorhydrine et on laisse se poursuivre la réaction sous agitation jusqu'à obtention d'un gel (environ une heure). Le gel résultant est neutralisé, broyé par un appareil à hélice puis débarrassé des sels contaminants par centrifugation. Les suspensions obtenues sont ensuite extrudées à très haute pression (1400 bars) par la presse de French. Trois cycles d'extrusion sont nécessaires pour obtenir une suspension homogène de particules de taille inférieure à 50 nm. Les particules ultra-broyées sont ensuite séchées de façon non aggrégative par atomisation.

20 6. Acylation des nanoparticules polysaccharidiques

Dans un ballon de 50 ml, nous introduisons 500 mg de nanoparticules que nous dispersons dans 10 ml de dichlorométhane anhydre. On ajoute 400 mg de diméthylaminopyridine (DMAP) et 400 mg de chlorure d'acide palmitique ou stéarique. La suspension est agitée à 37°C pendant 24 h. Le dichlorométhane est ensuite évaporé à l'évaporateur rotatif. Les nanoparticules acylées sont alors lavées à l'éthanol (3 fois) puis conservées dans l'éthanol à - 20°C.

30 7. Incorporation du dérivé peptidique 6 dans des noyaux polysaccharidiques acides de 25 nm sous forme acylée, et synthèse de BVSM

Afin d'éviter une modification chimique des peptides incorporés dans les noyaux polysaccharidiques lors de l'étape de synthèse

35

suivante d'acylation, le peptide a été chargé dans des noyaux acides préalablement acylés. L'étude a été réalisée avec le dérivé 6) ACTH, à savoir 1 mole d'ACTH pour 2 moles d'acide du noyau polysaccharidique acide acylé par l'acide plamitique. Après chargement du peptide, le feuillet
5 phospholipidique des BVSM est synthétisé par co-incubation avec des lécithines d'oeuf dans des proportions de 200 % de phospholipides par poids de noyaux acylés. Ces noyaux ont en effet une couverture d'acides gras peu dense qui autorise le chargement en peptide mais qui nécessite également l'apport de quantités de phospholipides recouvrants plus importantes pour
10 assurer la stabilité structurale du BVSM.

Ces BVSM présentent un taux d'incorporation de peptide 6) ACTH par poids de BVSM (46,6 % par poids de noyaux acylés) avec un rendement de 90 % de peptide incorporé par rapport au peptide de départ.

Il est donc possible de synthétiser des BVSM chargés en
15 peptides avec d'excellents rendements permettant de limiter les pertes en peptide lors des synthèses. On constate en particulier qu'à chaque essai successif, les quantités initiales de peptides ont été augmentées mais que le rendement est toujours resté de 90 %.

20 8. Etablissement de la couronne phospholipidique

Une suspension de liposomes est préparée par sonication au bain de 75 mg de lécithines hydrogénées dans 10 ml d'eau distillée (30 mn). On ajoute progressivement sous agitation 1 ml d'une suspension éthanolique
25 de noyaux acylés. La suspension résultante est ensuite soniquée au bain pendant 30 mn.

Dosage de l'acide pyruvique contenu dans le DC-15 et dans les noyaux polysaccharidiques.

10 mg de polysaccharide sont dissous dans 5 ml d'HCl 0,1 N et
30 placés dans un tube à essai. La solution est maintenue trois heures à 100°C puis ramenée à température ambiante et neutralisée par de la soude 0,2 N. L'acide pyruvique hydrolysé est dosé à l'aide du kit Sigma par rapport à une courbe étalon réalisée avec des échantillons d'acide pyruvique témoins.

Exemple 4 :

Etude de l'activité immuno-suppressive vis-à-vis de l'interleukine IL 1

- 5 Test utilisé : contrôle de l'activité anti-IL1 sur les cellules de Langerhans Thy 1.2⁺ et Ia⁺ de la souris C 57 BL.6

1. Matériel et méthodes

- 10 Des souris mâles C 57 - BL/6 âgées de 5 à 7 semaines, réparties à raison de 4 par cage, avec libre accès à l'eau et à la nourriture soumises à une photopériode de 12 h de lumière par 24 heures, reçoivent quotidiennement et pendant 5 jours consécutifs une application topique du peptide dans du propylène glycol (vol de 50 µl), sur la face dorsale de
15 l'oreille.

Le jour 6, les animaux sont sacrifiés. On procède au prélèvement des oreilles avec séparation de la face dorsale et de la face ventrale.

- 20 Les tissus de la face dorsale sont immergés dans de l'EDTA de Na (0,020 M) pendant 2 h à 37°C.

Après incubation, l'épiderme est prélevé sous forme de feuillet intact fixé à l'acétone et réhydraté dans du PBS (tampon phosphate).

Les CED (cellules épidermiques dendritiques) Thy 1-2⁺ et Ia⁺ sont identifiées par double marquage en immunofluorescence indirecte.

- 25 Le nombre de cellules par mm² est déterminé par les zones périphériques de même surface, pour chaque feuillet épidermique.

Les CED "cellules épidermiques dendritiques" portant le marqueur Ia⁺ ont été identifiées par l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-Ia⁺.

- 30 Les feuillets épidermiques sont fixés à l'acétone, puis incubés pendant 1 h à 37° C en présence de l'anticorps monoclonal anti-Ia⁺ et marqué par la méthode de l'immunoperoxydase indirecte (kit).

Après incubation pendant 10 minutes à 37°C avec une solution d'amino-éthyl-carbazol, la préparation est lavée au PBS.

Les CED Thy 1.2⁺ ont été indentifiées par double marquage en immunofluorescence indirecte. Les feuillets épidermiques ont été fixés à l'acétone puis réhydratés dans le PBS.

5 Les tissus marqués simultanément par des anticorps de souris anti-Thy 1.2⁺ dilués au 1:100 pendant 16 h à 4°C. Les échantillons de tissus ont été lavés trois fois dans du PBS pendant 60 mn puis incubés 60 mn à 37°C, soit avec des anticorps de chèvre anti-souris couplés à la rhodamine, dilués au 1:20, soit avec des anticorps de chèvre anti-lapin couplés à la
10 fluorescéine (fluorescine diluée au 1:20 dans le PBS. Les tissus ont ensuite été lavés dans le PBS avant d'être montés comme décrit précédemment).

Les témoins comportaient des feuillets épidermiques non marqués à l'anticorps primaire et incubés uniquement en présence des réactifs secondaires, afin de mettre en évidence d'éventuelles réactions
15 croisées avec les anticorps conjugués à la rhodamine et à la fluorescéine.

Le nombre de cellules de Langerhans Ia⁺ ou de CED Thy 1.2⁺ par millimètre carré a été déterminé dans quatre zones périphériques de même surface pour chaque feuillet épidermique. Au moins quatre animaux ont été étudiés dans chacun des groupes. La densité de cellules de
20 Langerhans Ia⁺ et de CED Thy 1.2⁺ est indiquée pour chaque mesure.

2. Résultats

Le tableau I résume les résultats mettant en évidence
25 l'activité immuno-suppressive des peptides selon l'invention obtenus à partir de 4 lots de 4 souris C57-BL6.

Déjà à une concentration de 0,1 ng, les peptides provoquent une diminution de l'apparition des phénotypes de cellules dendritiques épidermiques de classe Thy 1.2⁺, effet qui est amplifié à la concentration
30 de 1 ng. En revanche, les peptides restent sous effet sur les phénotypes des cellules dendritiques épidermiques de classe Ia⁺, ce qui présente l'avantage de ne pas perturber le fonctionnement du système immunitaire cutané, et apporte la démonstration d'une action immuno-suppressive spécifique.

Ces résultats montrent également que les peptides selon l'invention, correspondant à des fragments (4-10) de l' α -MSH, ont un effet plus marqué que la molécule d' α -MSH (1-10), elle-même.

5

Exemple 5 :

Etude de la Mélanogénèse

10

Les difficultés rencontrées pour obtenir des cultures "in vitro" de mélanocytes normaux ou de grandes populations de mélanocytes, à partir de tissus d'animaux, obligent les chercheurs à utiliser des cellules tumorales de mélanomes de souris.

15

Ces techniques, si elles ont permis de mieux connaître les mécanismes fondamentaux, sont peu adaptées à l'évaluation des molécules dites activateurs de mélanogénèse.

20

Ces cellules tumorales sécrètent normalement et de façon abondante de la tyrosinase, ce qui présente l'inconvénient majeur d'amplifier les résultats, particulièrement lorsqu'il s'agit de composés à base de tyroxine.

La mélanogénèse est sous la dépendance de neuropeptides qui activent la tyrosinase ; l'évaluation de cette activation ne peut s'effectuer valablement que sur les mélanocytes normaux en culture.

25

On a mis au point un modèle expérimental de culture de mélanocytes d'embryons d'amphibiens, dont le système limbique se rapproche de celui des mammifères, et qui permet de réaliser le screening des différentes molécules avec une précision statistiquement significative.

On a utilisé des oeufs embryonnés de Triton Crète (Tritus Cristatus).

30

Les mélanocytes sont d'origine neurale. Ils sont prélevés dès les premiers jours de l'embryogénèse dans le neurectoderme, et mis en culture dans du milieu de BARTH'S, enrichi en endoderme et contenant des dilutions croissantes des peptides à tester.

35

Après incubation à 25°C pendant 24 heures, l'activité des composés peptidiques s'apprécie par dosage de la mélanine contenue dans les mélanosomes, comparativement à des témoins non stimulés.

Le taux de mélanine par cellule est apprécié directement au microscope confocal Zeiss-Scanning-Laser Microscope (S.M.L. Zeiss) par fluorescence.

1. Matériel et méthodes

Les mélanocytes sont prélevés à l'aide de micropipettes automatiques d'un Microscope Zeiss inversé, équipé pour la chirurgie cellulaire.

Les embryons sont immobilisés dans la chambre de manipulation du microscope, en milieu physiologique et atmosphère d'azote.

Les prélèvements s'effectuent avec précision, sous surveillance d'un écran d'ordinateur couplé à l'appareil et programmé.

Les mélanocytes prélevés sont mis en culture dans le milieu de BARTH'S contenant 3,5% de paraformaldéhyde pendant 30 minutes à 22°C.

On lave deux fois, à l'aide de la solution de BARTH'S.

Les cultures sont mises à incuber dans le milieu de BARTH'S conditionné par 1% d'extrait de triton d'endoderme de l'embryon à la température de 22°C

On ajoute des dilutions croissantes d'hormones peptidiques à 0,1 mg - 0,5 mg - 1 mg - et 1,5 mg pour 50 µl

On laisse incuber la culture pendant 20 à 24 heures à 22°C
Les cellules sont délicatement centrifugées à 300 g pendant 3 minutes.

Elles sont mises à incuber rapidement dans un milieu de BARTH'S en présence d'isothiocynate de fluorescéine FITC pendant 30 minutes.

Après lavage avec 3,5% de paraformaldéhyde en solution de BARTH'S et centrifugées, elles sont mises en suspension, et fixées sur lames, selon les procédés classiques.

Le dosage de la mélanine s'effectue par analyse confocale microscopique à l'aide du microscope Zeiss S.L.M.

Les mesures s'effectuent par Argon-Laser à 488 nm et 514 nm en fluorescence avec objectif 63 x Plan-Néofluar en mode opératoire
5 préprogrammé.

Chaque image individuelle est visualisée sur écran et stockée sur disque.

Le taux de mélanine par cellule et le nombre de cellules traitées et témoins sont directement exprimés sous forme de graphique à
10 l'aide de l'ordinateur du microscope.

2. Résultats

Le tableau II représente les résultats pour un échantillon
15 peptidique (3) testé comparativement au témoin. L'échantillon témoin est représenté par une culture cellulaire en milieu de BARTH'S, non activée.

Il a été réalisé trois séries de cultures cellulaires selon un protocole rigoureusement identique.

Les doses d'hormones peptidiques ont été standardisées à 0,1 -
20 0,5 - 1 - et 1,5 mg.

Les taux de dopa-mélanine sont exprimés en μg pour cent mille cellules.

25

30

35

TABLEAU I

Echantillons	Doses Nanog. (ng)	NOMBRE DE CELLULES Thy 1.2 ⁺ et la ⁺ par mm ² d'épiderme									
		Cellules Thy 1.2 ⁺				Moyenne	s	Cellules la ⁺			
		1	2	3	4			1	2	3	4
Témoins FG	-	380	376	387	410	388		498	502	500	510
I	0.1	298	302	310	305	303	22	490	495	496	500
	0.5	300	290	305	300	298	23.2	480	488	490	498
	1	268	265	280	276	272	29.9	476	482	487	499
II	0.1	290	280	285	292	286	26.3	418	445	435	450
	0.5	276	268	270	286	275	29.2	415	432	430	445
	1	260	262	260	270	263	32.3	415	420	425	432
III	0.1	323	320	318	321	320	17.6	490	500	495	505
	0.5	318	315	310	316	320	17.6	488	498	480	500
	1	316	312	310	312	312	19.6	480	495	478	492

Résultats exprimés sur 4 lots de 4 souris C 57 BL-6

- I : Hydroxybutyryl (4 - 10) ACTH
 II : Hydroxybutyryl (4 - 10) ACTH
 III: (1 - 10) α MSH

T A B L E A U N° II.

Echantillons testés	Doses Nanogrammes	Mélanine en microgrammes pour 1.10^5 cellules			Moyenne
		Série I	Série II	Série III	
Témoin	-	0,28 µg	0,33 µg	0,35 µg	0,35 µg
Peptide	0,1 ng	2,15 µg	2,22 µg	2,30 µg	2,22 µg
	0,5 ng	3,65 µg	3,55 µg	3,60 µg	3,60 µg
	1 ng	3,55 µg	3,60 µg	3,65 µg	3,60 µg
	1,5 ng	3,10 µg	3,15 µg	3,10 µg	3,17 µg

H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH (3)

Exemple 6 :

Pharmacologie

5 Deux produits ont été testés comparativement sur l'évolution de l'hypersensibilité cutanée :

JL 641, peptide numéro 6 sous forme lyophilisée

JL 641 B, peptide numéro 6 sous forme de complexe polysaccharidique

10 1. Matériel et méthodes

Des souris femelles C57 BL/6 âgées de 5 semaines sont réparties en 7 lots de 10 animaux (5 par cage) avec libre accès à l'eau et à la nourriture, soumises à une photopériode de 12 heures de lumière par 24 heures. Les animaux des lots I, II et III reçoivent quotidiennement et par application topique sur la peau rasée du dos le JL 641 lyophilisé (mis en solution dans du propylène glycol) sous un volume constant de 50 µl et pendant 5 jours consécutifs.

Les animaux des lots IV, V et VI reçoivent identiquement du JL 641 préparé sous forme de Nanosomes Polysaccharidiques préparés selon l'exemple 3, codés JL 641 B

Pour chaque produit trois doses sont retenues :

25 JL 641 : Lot I : 2,5 µg/souris/jour

Lot II : 0,5 µg/souris/jour

Lot III : 0,1 µg/souris/jour

JL 641 B : Lot IV : 2,5 µg/souris/jour

Lot V : 0,5 µg/souris/jour

Lot VI : 0,1 µg/souris/jour

30 Les animaux du lot VII servent de témoins (ils reçoivent seulement 50 µl de propylène glycol par application topique.

Au jour 5, trente minutes après la dernière application, toutes les souris sont sensibilisées avec 25 µl de DNFB (2,4-dinitro-1 fluoro

benzène à 2% dans un mélange 4:1 d'acétone et trioléïne appliqué sur la région dorsale de peau rasée.

Au jour 6, on procède à une nouvelle sensibilisation par application de DNFB.

5 Au jour 11, l'épaisseur des oreilles des souris est mesurée à l'aide d'un micromètre afin d'obtenir des valeurs de base puis les oreilles sont stimulées par application de 20 µl de DNFB à 0,8%.

10 Au jour 12, l'épaisseur des oreilles est à nouveau mesurée. On établit la valeur moyenne de l'épaississement des oreilles pour les souris des lots I, II, III, IV, V et VI qui ont reçu les produits à étudier, ainsi que pour les souris du lot VII qui n'ont eu que propylène glycol.

Le pourcentage de suppression éventuelle sera exprimé par le calcul suivant :

$$15 \quad \frac{T - E}{T} \times 100$$

T représentant l'épaisseur moyenne des oreilles du lot témoin et E l'épaisseur moyenne des oreilles des différents lots.

2. Résultats :

20

Les résultats sont reportés sur les tableaux V et VI ci-après :

Tableau V

25	<p>4 DE SUPPRESSION PAR RAPPORT AU LOT TEMOIN</p> <p>SELON LA FORMULE : $\frac{T - E}{T} \times 100$</p>					
30	<p>LOT I</p> <p><u>JL 641 LYOPHILISE</u></p> <p>2,5 µg/souris/jour</p>		<p>LOT II</p> <p><u>JL 641 LYOPHILISE</u></p> <p>0,5 µg/souris/jour</p>		<p>LOT III</p> <p><u>JL 641 LYOPHILISE</u></p> <p>0,1 µg/souris/jour</p>	
	Oreille Gauche	Oreille Droite	Oreille Gauche	Oreille Droite	Oreille Gauche	Oreille Droite
35	- 31,53	- 32,50	- 30,67	- 30,63	- 30,14	- 31,65

Tableau VI

Traitement JL 641 B

5	% DE SUPPRESSION PAR RAPPORT AU LOT TEMOIN SELON LA FORMULE : $\frac{T - E}{T} \times 100$					
10	LOT IV <u>JL 641 B</u> 2,5 µg/souris/jour		LOT V <u>JL 641 B</u> 0,5 µg/souris/jour		LOT VI <u>JL 641 B</u> 0,1 µg/souris/jour	
	Oreille Gauche	Oreille Droite	Oreille Gauche	Oreille Droite	Oreille Gauche	Oreille Droite
15	- 67,66	- 67,89	- 67,38	- 70,28	- 53,27	- 55,66

20

L'examen des tableaux montre que l'activité du peptide JL 641 sous forme lyophilisée et administrée par voie topique diminue la réaction d'hypersensibilité cutanée d'environ 30%.

25

Le même peptide présenté sous forme microcapsulé de Nanosomes à structures polysaccharidiques (JL 641 B) induit une forte diminution de l'hypersensibilité cutanée comprise entre 53 et environ 70%.

30

Ces résultats montrent non seulement une bonne activité du peptide seul, mais également une potentialisation particulièrement inattendue lorsqu'il est couplé à un polysaccharide.

35

REVENDECATIONS

1. Complexe du type comprenant au moins un peptide capable d'induire une activité anti-inflammatoire, anti-allergique ou immuno-
5 suppressive vis-à-vis des interleukines du groupe IL1 - IL6 - α TNF, présentant une séquence d'au moins quatre acides aminés extraits de l' MSH, lesdits acides aminés étant sous forme naturelle ou non, conjugués physiquement ou chimiquement à un élément polysaccharidique de haut poids moléculaire.
- 10 2. Complexe selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'élément polysaccharidique est un polysaccharide réticulé.
3. Complexe selon 1 à 2 caractérisé en ce que le polysaccharide est d'origine bactérienne.
4. Complexe selon 1 à 3 caractérisé en ce que le polysaccharide
15 provient d'une souche de *Klebsiella pneumoniae*.
5. Complexe selon 1 à 4 caractérisé en ce qu'il comprend un peptide de formule :
- X-Glu-His-A-Arg-Trp-Gly-Y
- dans laquelle A représente Phe ou DPhe, et X et Y sont choisis parmi :
- 20 - les fonctions acides ou aminées de l'acide aminé correspondant
- une séquence d'acide aminé ne comprenant pas plus de quatre acides aminés
ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels, d'esters ou d'amides.
- 25 6. Complexe selon 1 à 5 caractérisé en ce que X est choisi parmi HMet-, HNle-, H-Ser-Tyr-Ser-Met-, H-Ser-Tyr-Ser-Nle, Ac-Nle-, Ac-Leu-, Ac-Ile, et Y choisi parmi -NH₂, -OH.
7. Complexe selon 1 à 6 caractérisé en ce que les dérivés des peptides sont choisis parmi les sels, les esters et les amides des
30 groupements biochimiques inhibant ou bloquant les phosphodiesterases.

8. Complexe selon 1 à 7 caractérisé en ce que les dérivés des peptides sont choisis parmi les sels, les esters ou les amides

- d'acides alcools
- de diacides
- 5 - de nucléotides non naturels.

9. Complexe selon 1 à 8 caractérisé en ce que les acides alcools et les diacides sont choisis parmi les acides contenant de trois à six atomes de carbone et les dérivés acylés ou diacylés du glycol ou du glycérol.

10 10. Complexe selon 1 à 9 caractérisé en ce que les acides alcools sont les acides hydroxybutyriques et méthyl hydroxybutyriques.

11. Complexe selon 1 à 10 caractérisé en ce que les nucléotides non naturels présentent un groupement triphosphate en position 3 avec un radical -CH₂ au lieu de -O-.

15 12. Complexe selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence d'acides aminés partiellement racémisée.

13. Peptide biologiquement actif caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence de formule :

20 X-Glu-His-A-Arg-Trp-Gly-Y

dans laquelle A représente Phe ou DPhe, X est choisi parmi HMet-, HNle-, H-Ser-Tyr-Ser-Met-, H-Ser-Tyr-Ser-Nle, Ac-Nle-, Ac-Leu-, Ac-Ile, et Y choisi parmi -NH₂, -OH.

25 14. Peptide selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les séquences :

- 1) H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly - NH₂
- 2) H-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly - NH₂
- 3) H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH
- 4) H-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-NH₂
- 30 5) H-Met-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly-NH₂
- 6) Ac-Nle-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly-NH₂

7) Ac-Leu-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly-NH₂

8) Ac-Ile-Glu-His-Dphe-Arg-Trp-Gly-NH₂

ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels, d'esters ou d'amides.

5 15. Peptides selon l'une des revendications 13 et 14 caractérisés en ce qu'ils sont choisis parmi les sels, les esters et les amides de groupements biochimiques inhibant ou bloquant les phosphodiestérases.

16. Peptide selon l'une des revendications 13 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence en acides aminés partiellement
10 racémisée.

17. Microsphère caractérisée en ce qu'elle contient au moins un complexe selon l'une des revendications 1 à 12 recouvert de feuillets d'acides gras et/ou de phospholipides.

18. Microsphère selon la revendication 17 caractérisée en ce
15 que les acides gras sont faiblement greffés et que les phospholipides sont interdigités.

19. Médicament caractérisé en ce qu'il comprend un complexe selon 1 à 12, un peptide selon 13 à 16, ou une microsphère selon 17 et 18, administré par voie orale ou injectable.

20 20. Composition galénique pour application topique externe caractérisée en ce qu'elle comprend un complexe selon 1 à 12, une microsphère selon 17 et 18, ou un peptide selon 13 à 16.

21. Composition galénique selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une composition dermatologique pouvant
25 être aussi bien utilisée en cosmétologie qu'en dermo-cosmétologie.

22. Composition galénique selon l'une des revendications 20 et 21, caractérisée en ce qu'il s'agit de préparations dermato-cosmétologiques, sous forme de solutions, de lotions, d'émulsions ou de crèmes utilisées comme accélérateur de bronzage de la peau, comprenant au moins un des
30 complexes ou peptides selon les revendications 1 à 16.

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9206361
FA 471884
Page 1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	EP-A-0 381 070 (FARMHISPANIA SA) 8 Août 1990 * page 6, ligne 13 - page 6, ligne 16 *	1-2,5-6
X	NL-A-6 509 727 (ORGANON NV) 30 Janvier 1967 * exemple 2 *	13-14,16
X	EP-A-0 232 697 (A BERTOLINI) 19 Août 1987 * revendication 1 *	13-14, 16,19
X	EP-A-0 146 113 (D ADERHOLD) 26 Juin 1985 * revendication 4 *	13,14
X	EP-A-0 292 291 (UNIVERSITY PATENTS INC) 23 Novembre 1988 * le document en entier *	13-14, 16,19
A	WO-A-9 003 798 (CANCER RESEARCH CAMPAIGN TECHNOLOGY LIMITED) 19 Avril 1990 * revendication 1 *	1
X	PEPTIDES vol. 10, no. 2, Février 1989, FAYETTEVILLE, N Y, USA pages 361 - 368 B E BECKWITH ET AL. 'the effects of structure-conformation modifications of melanotropin analogs on learning and memory; d-amino acid substituted linear and cyclic analogs' *composé 4 , tableau 1*	13-16,19
Date d'achèvement de la recherche 10 FEVRIER 1993		Examinateur p. masturzo
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9206361
FA 471884
Page 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY. vol. 30, no. 11, Novembre 1987, WASHINGTON US pages 2126 - 2130 V J HRUBY ET AL. 'alpha-melanotropin: the minimal active sequence in the frog skin bioassay' * tableau 1 *	13-16, 19
X	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 112, no. 19, 7 Mai 1990, Columbus, Ohio, US; abstract no. 172440r, M LOW ET AL. 'role of chain termini in selective steroidogenic effect of ACTH/MSH (4-10) on isolated adrenocortical cells' page 96 ;colonne G ; & PEPTIDES vol. 11, no. 1, 1990, FAYETTEVILLE, N Y, USA pages 29 - 31	13-16, 19
X	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 100, no. 1, 2 Janvier 1984, Columbus, Ohio, US; abstract no. 630p, J M VAN REE 'the influence of neuropeptides related to pro-opiomelanocortin on acquisition of heroin self-administration of rats' page 54 ;colonne DR ; & LIFE SCIENCES vol. 33, no. 23, 1983, pages 2283 - 2289 --- -/--	13-16, 19
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL5)
Date d'achèvement de la recherche 10 FEVRIER 1993		Examineur p. masturzo
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9206361
FA 471884
Page 3

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 98, no. 13, 28 Mars 1983, Columbus, Ohio, US; abstract no. 107741t, H P C DRIESSEN ET AL. 'synthesis of an analog of alpha-MSH (1-10) decapeptide as a substrate for enzymic n-alpha-acetylation' page 642 ;colonne DR ; * abrégé * & INT. J. PEPT. PROT. RES. vol. 20, no. 4, 1982, pages 289 - 297	13-16,19
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 93, no. 17, 27 Octobre 1980, Columbus, Ohio, US; abstract no. 161661b, J M STEWART ET AL. 'inhibition of development of tolerance to morphine by a peptide related to ACTH' page 107 ;colonne GA ; * abrégé * & ADV. BIOCHEM. PSYCHOPHARMACOL. vol. 22, 1980, pages 305 - 312	13-16,19
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
Date d'achèvement de la recherche 10 FEVRIER 1993		Examinateur p. masturzo
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9206361
FA 471884
Page 4

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	<p>BIOLOGICAL ABSTRACTS vol. 75, no. 12 , 1983, Philadelphia, PA, US; abstract no. 88129, H GEYER ET AL. 'immunochemical properties of oligosaccharide-protein conjugates with Klebsiella K2 specificity: 2: Protective capacity of the conjugates and anti-conjugate antibodies against infection with Klebsiella pneumoniae 01:K2 in mice' * abrégé * & MED. MICROBIOL. IMMUNOL. vol. 171, no. 3, 1982, pages 135 - 1944</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
Date d'achèvement de la recherche 10 FEVRIER 1993		Examinateur p. masturzo
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		